

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌ی اتانولی برگ درخت گردو بر روی پروپیونی باکتریوم آکنه

علی شرافتی چالشتی^۱، رضا شرافتی چالشتی^۲، فرهاد شرافتی چالشتی^۳، دکتر محمود رفیعیان^۴

نویسنده‌ی مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران sharafati33@yahoo.com

دریافت: ۸۸/۶/۲۳ پذیرش: ۸۸/۱۱/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: جوش جوانی یکی از مشکلات پزشکی است و پروپیونی باکتریوم آکنه به عنوان یک عامل اصلی در این بیماری مورد توجه قرار دارد. اثرات ضد میکروبی قسمت‌های مختلف درخت گردو بر روی بسیاری از باکتری‌ها به اثبات رسیده است. برگ گردو همچنین اثر آنتی اکسیدانی داشته و بنابراین اگر دارای اثر ضد باکتریایی بر روی پروپیونی باکتریوم آکنه نیز باشد، می‌تواند به عنوان یک داروی جایگزین برای درمان این بیماری مطرح گردد. لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر آنتی باکتریال عصاره‌ی برگ درخت گردو بر روی پروپیونی باکتریوم آکنه در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه‌ی تجربی، عصاره‌ی اتانولی برگ درخت گردو تهیه و اثرات ضد میکروبی آن به روش چاهک - دیفیوژن، تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) با روش رقت لوله‌ای علیه پروپیونی باکتریوم آکنه انجام شد، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم) به عنوان کنترل مثبت بکار رفت.

یافته‌ها: عصاره‌ی اتانولی برگ درخت گردو در هر دو روش آگار دیفیوژن و ماکرودایلوژن بر روی باکتری پروپیونی باکتریوم آکنه دارای اثر مهاري بود. بیشترین هاله عدم رشد در غلظت ۱۵۰ میلی گرم در میلی لیتر معادل $25 \pm 1/7$ میلی متر، مقدار MIC برابر $12/5$ میلی گرم در میلی لیتر و مقدار MBC معادل ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر بود.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که عصاره‌ی اتانولی برگ درخت گردو دارای اثر ضد میکروبی بر روی پروپیونی باکتریوم آکنه بوده، می‌تواند به عنوان فرآورده‌ای آنتی باکتریال در درمان عفونت‌های خارجی حاصل از این میکروارگانیسم مطرح گردد.

واژگان کلیدی: اثرات ضد میکروبی، برگ درخت گردو، پروپیونی باکتریوم آکنه

مقدمه

آکنه ولگاریس بیماری است که به درجات مختلف در سنین نوجوانی و بلوغ دیده می‌شود. در آمریکا، سالانه حدود ۲ میلیون نفر به آکنه شدید نیازمند به درمان مبتلا می‌شوند (۱). متأسفانه برآورد آماری دقیقی از تعداد مبتلایان در ایران در دست نیست، اما این مشکل در کشور ما نیز همچون سایر نقاط دنیا قابل توجه است. در ایجاد این بیماری بسیار شایع،

۱- دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی

۲- دانشجوی دکترای تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

۳- کارشناس ارشد میکروب شناسی، مربی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی

۴- دکترای تخصصی فارماکولوژی، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی

مزمّن و عودکننده عوامل متعددی نظیر ریزش سلولی غیرطبیعی اپیتلیوم فولیکول‌های مو، افزایش ترشح سبوم و تکثیر پروپیونی باکتریوم آکنه و التهاب دخیل هستند (۲). این باکتری جزو فلور ساکن در فولیکول‌های مو و غدد چربی است (۳). هدف اصلی درمان آکنه جلوگیری از ایجاد اسکارهای ناشی از آن در دراز مدت و اثرات نامطلوب روانی این بیماری و افت توانایی شخص در برقراری ارتباطات اجتماعی و مشکلات ناشی از آن در تمام مراحل زندگی شخص است (۴). در این مسیر آنتی‌بیوتیک‌های خوراکی و موضعی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. اما مشکل بزرگی که در پی استفاده گسترده از این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان آکنه ایجاد شده است، مقاومت دارویی است. آمارهای ذکر شده در مورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آکنه گویای مقاومت ۱۳ درصدی به اریترومايسين، ۱۰/۷ درصدی به کلیندامایسین و ۷/۱ درصدی به کوتریموکسازول است. این آمارها نشانگر مقاومت بالای پروپیونی باکتریوم آکنه به این آنتی‌بیوتیک‌هاست که علاوه بر عوارض ناشی از شکست درمان، بار مالی فراوان و عوارض جانبی آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی را نیز به همراه دارد (۵). گردو (*Juglans Regia*) گیاهی از خانواده‌ی *Juglandaceae* دارای ۲۱ گونه می‌باشد که همگی خزان دار و دارای میوه‌ی خوراکی هستند. از پوست درخت و پوست سبز گردو به عنوان ماده‌ی قابض، همچنین جهت درمان ورم مفاصل، شست و شو و التیام زخم‌ها و درمان ترشحات زنانه و بیماری سل استفاده می‌شود (۶). با توجه به اشارات متعدد مبنی بر اثرات ضد میکروبی گیاهان دارویی بومی ایران (۷)، از جمله گردو بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آیروژینوزا و باسیلوس سریوس (۸) و همچنین اثرات دارویی منطقه‌ی Jeju کره، بر روی پروپیونی باکتریوم آکنه (۹و ۳) و با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، در اثر مصرف داروهای ضد میکروبی جهت پیشگیری و درمان

عفونت‌ها و همچنین عوارض جانبی و اثرات سو و متفاوت آن‌ها، بررسی و تحقیق بر روی گیاهان دارویی به منظور کشف منابع جدید دارویی بر علیه عفونت‌های باکتریایی مورد نیاز می‌باشد. لذا استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات شیمیایی آن‌ها می‌تواند فواید بالقوه‌ای در حل این مشکلات داشته باشد. در سال‌های اخیر بر جایگزین نمودن مواد طبیعی در کنترل و درمان عفونت‌ها و بیماری‌های مختلف به جای داروهای شیمیایی صنایع دارای اثرات جانبی نامطلوب تاکید می‌گردد (۱۰). قسمت‌های مختلف گردو از جمله پوست سبز روی میوه گردو، پوست درخت، مغز و برگ گردو در داروسازی مورد استفاده هستند و تا حدودی اثر ضد میکروبی نیز از خود نشان داده‌اند (۶). ولی برگ گردو به دلیل فراوانی، در دسترس بودن و امکان تهیه‌ی ارزان آن بدون اینکه به درخت آسیب برساند، اگر موثر باشد، می‌تواند جانشین مناسبی برای داروهای سنتتیک و غیر سنتتیک باشد. در این تحقیق سعی گردید که اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی این گیاه بر روی باکتری پروپیونی باکتریوم آکنه به صورت آزمایشگاهی بررسی شود.

روش بررسی

این مطالعه به صورت تجربی آزمایشگاهی در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شد. جهت انجام این مطالعه از سویه‌ی استاندارد باکتری پروپیونی باکتریوم آکنه (ATCC ۱۱۸۲۷) تهیه شده از موسسه تحقیقات و سرم سازی رازی کرج استفاده شد. برای این منظور از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری بر روی محیط تیوگلیکولات براث و آگار خونی در شرایط بی‌هوازی، سوسپانسونی با کدورت معادل لوله ۰/۵ مک فارلند در نرمال سالین تهیه شد. در این شرایط تعداد باکتری‌ها حدود 1×10^8 CFU در میلی‌لیتر بود. از این سوسپانسیون در مراحل بعدی آزمایش‌ها استفاده گردید (۱۱).

اندازه‌گیری قطر هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌ی گیاهی، ثبت شد (کلیه‌ی آزمایش‌ها ۳ بار تکرار گردید) (۱۲).

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC): آزمایش‌ها در دو مرحله طراحی و از روش اصلاح شده ماکرودایلوشن توصیه شده توسط NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) استفاده گردید (۱۳). بدین ترتیب که سوسپانسیون با غلظت معادل لوله‌ی ۰/۵ مک فارلند از باکتری در محیط تیوگلیکولات برآت تهیه شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت تاثیر رقت‌های متوالی در غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تحت شرایط بی‌هوازی قرار گرفت و بعد از ۲۴ ساعت با مشاهده‌ی کدورت و یا عدم ایجاد کدورت در لوله‌ها، مقدار MIC تعیین شد. MIC عبارت است از حداقل غلظتی از عصاره‌ی که مانع از رشد باکتری شده و کدورت حاصل از رشد دیده نشود. برای تعیین MBC، از لوله‌هایی که در آنها کدورت دیده نشد بر روی محیط کشت Blood agar در شرایط بی‌هوازی کشت مجدد داده شد و با روش رقت‌های متوالی عمل شمارش کلنی صورت گرفت. اولین لوله‌ای که مقدار کاهش رشد تعداد باکتری‌های آن نسبت به زمان صفر لوله‌ی شاهد، بیشتر از یک هزارم بود، به عنوان MBC انتخاب شد. گاهی اوقات غلظت MBC برابر با مقدار MIC است (در این روش نیز کلیه‌ی آزمایش‌ها ۳ بار تکرار گردید) (۱۲).

یافته‌ها

نتایج نشان داد که عصاره‌ی اتانولی برگ درخت گردو بر رشد باکتری پروپیونی باکتریوم آکنه دارای اثر مهاری بود. میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد (با انحراف معیار) ایجاد شده توسط عصاره‌ی اتانولی برگ درخت گردو بر رشد باکتری

عصاره‌ی گیاه: برگ‌های درخت گردو از درختان گردوی ناحیه‌ی سامان (حاشیه‌ی شهر شهرکرد) در بهار سال ۱۳۸۸ جمع‌آوری و پس از شناسایی و تایید توسط مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان چهارمحال و بختیاری، نمونه‌ای از آن در واحد هرباریوم مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به شماره‌ی ۲۰۳ ضبط گردید. مواد گیاهی جمع‌آوری شده پس از تمیز کردن، در سایه‌ی خشک شده و توسط آسیاب پودر گردید. برای تهیه‌ی عصاره‌ی اتانولی، ۱۰۰ گرم از پودر خشک شده‌ی گیاه با ۵۰۰ سی سی اتانول ۸۰ درصد، مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (حدود ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) نگهداری شد. سپس عصاره‌ی به‌دست آمده، توسط کاغذ صافی فیلتر شده، وارد دستگاه روتاری (برای حذف حلال) گردید. عصاره‌ی الکلی به‌دست آمده در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور خشک شد. پس از آن مقدار ۱ گرم از عصاره‌ی الکلی خشک حاصله را به ۵ سی سی از حلال دی متیل سولفاکساید (DMSO) اضافه نموده، به وسیله‌ی سرنگ میلی پور با فیلترهای به قطر ۰/۲۲ میکرون فیلتره گردید (۷).

بررسی حساسیت میکروبی: برای تعیین حساسیت ضد میکروبی، از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم) به عنوان کنترل مثبت و از حلال خالص دی متیل سولفاکساید (DMSO) به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. برای اطمینان از تاثیر عصاره‌ی اتانولی بر روی باکتری مورد نظر، ابتدا باکتری با غلظت‌های متفاوت عصاره، تحت تاثیر قرار گرفت. برای این منظور چاهک‌هایی به قطر ۷ میلی‌متر در محیط کشت مولر هیتون آگار ایجاد شد که پس از کشت باکتری از سوسپانسیون باکتریایی معادل لوله‌ی ۰/۵ مک فارلند بر روی محیط، عصاره‌ی گیاهی با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی تحت انکوباسیون قرار گرفته و نتایج بر اساس

پروپیونی باکتریوم آکنه در جدول ۱ ارایه شده است. همچنین نتایج حاصل از تعیین مقدار MIC و MBC به ترتیب ۱۲/۵ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر نشان داده شد.

جدول شماره ۱: میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره‌ی اتانولی برگ درخت گردو بر روی پروپیونی باکتریوم آکنه

غلظت عصاره (میلی گرم در میلی لیتر)	هاله‌ی عدم رشد (میلی متر)
۲۵	$8 \pm 1/3$
۵۰	$12 \pm 1/3$
۷۵	$14 \pm 0/66$
۱۰۰	$18 \pm 0/66$
۱۲۵	$20 \pm 1/1$
۱۵۰	$25 \pm 1/7$

بحث

در این تحقیق اثر ضد میکروبی عصاره‌ی برگ درخت گردو بر روی باکتری پروپیونی باکتریوم آکنه مورد آزمایش قرار گرفت که با توجه به نتایج، عصاره‌ی اتانولی گیاه بر رشد باکتری در غلظت ۱۵۰ میلی گرم در میلی لیتر بیشترین اثر مهاری با میانگین هاله‌ی عدم رشد دارای انحراف معیار $25 \pm 1/7$ میلی متر را داشت. همچنین میزان MIC و MBC عصاره‌ی اتانولی گیاه به ترتیب معادل ۱۲/۵ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر تعیین گردید. در مطالعات دیگری اثرات ضد میکروبی عصاره‌ی برگ درخت گردو بر روی باکتری‌های گرم مثبت نظیر باسیلوس سریوس، باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اریوس و باکتری‌های گرم منفی از جمله اشریشیاکلی، پزودوموناس آیروژینوزا، کلبسیلا پنومونیا صورت گرفته، اثرات ضد باکتریایی آن به اثبات رسیده است (۸ و ۱۴). همچنین در مطالعه‌ای توسط مهربانیان و همکاران اثرات ضد میکروبی عصاره‌ی آبی، متانولی و کلروفرمی سه

گیاه از جمله گردو بر روی باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سریوس، باسیلوس مایکوییدس و بعضی قارچ‌ها نظیر آسپرژیلوس نیجر، پنی‌سیلیوم اکسپانسونم و ژئوتریکوم کاندیدوم بررسی شده و اثرات ضد میکروبی آن‌ها به صورت میکروبی سیدال گزارش گردیده است (۱۵). که نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر نیز با مطالعات مذکور همخوانی دارد. در مطالعه‌ی دیگری توسط نریمان و همکاران، فعالیت ضد باکتریایی شش گیاه بومی ایرانی از جمله گردو بر علیه هلیکوباکتر پیلوری بر روی نمونه‌های کلینیکی، با استفاده از تست حساسیت ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن به اثبات رسیده است (۱۰). در این تحقیق نیز که به روش‌های چاهک- دیفیوژن و رقت‌های لوله‌ای انجام گرفت، اثر ضد باکتریایی برگ گردو نشان داده شد و میزان MIC و MBC نیز تعیین گردید.

ترکیبات فنلی از مواد بارز برگ گردو هستند بطوریکه در تحقیقات انجام شده بیش از ده ترکیب فنولی همانند: ۳- کافوییل کوینیک اسید، ۵- کافوییل کوینیک اسید، ۳- پی‌کوماروییل کوینیک اسید، ۴- پی‌کوماروییل کوینیک اسید، پی‌کوماریک اسید، کویرستین ۳ گالاکتوزید، کویرستین ۳- پنتوزید، کویرستین ۳ آرابینوزید، کویرستین ۳ گریلوزید، کویرستین ۳ رامنوزید از برگ این گیاه شناسایی شده است. در مجموع تا ۷۳ گرم در هر کیلوگرم برگ خشک گردو را ترکیبات فنولی تشکیل داده‌اند و حدود ۶۳ درصد از این ترکیبات فلاونونها هستند. فلاونوئیدها نیز همانند آپیگنین، گالانجین، پینوسمبرین، پونسیرتین، جنکوانین، سوفورافلاونون G، نارینجین، نارینجینین، اپیگالوکاتشین گالات، لوتیلین، ایزوفلاون، فلاونول گلیکوزید، هیدروکسی سینامیک اسید و ۵- هیدروکسی ۱۰ نفتوکوئینون به عنوان عوامل آنتی میکروبیال شناسایی شده‌اند (۱۷-۱۴).

ترکیبات فنولی در بسیاری از گیاهان دیگر نیز وجود دارند و اثر ضد میکروبی آن‌ها بستگی به محل و تعداد گروه‌های

موثرند (۲۹). نظر به اینکه عوامل اکسیداتیو مثل اشعه‌ی UV از عوامل تشدید کننده‌ی آکنه هستند بنابراین عصاره‌ی برگ گردو با اثر ضد میکربی روی عامل میکربی آکنه، مهار عوامل اکسیداتیو تشدید کننده‌ی آکنه و همچنین ممانعت از ایجاد ظاهری با سن بالا در بیماران می‌تواند به عنوان یک داروی مفید در درمان جوش‌های جوانی مطرح باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که برگ درخت گردو از ویژگی‌های ضد باکتریایی قابل توجهی در شرایط invitro برخوردار است و این یافته‌ها می‌تواند زمینه‌ی تحقیقات بیشتری را در آینده برای شناسایی، تعیین مقدار و تخلیص ترکیبات موثره‌ی آن در شرایط in vivo فراهم و به عنوان یک ماده‌ی ضد باکتریایی برای درمان بیماری آکنه مورد استفاده قرار گیرد. همچنین با توجه به درمان طولانی مدت جوش جوانی و باکتری پروپیونی باکتریوم آکنه به عنوان مهم‌ترین عامل باکتریایی در ایجاد آن و احتمال مقاومت دارویی، می‌توان عصاره‌ی برگ گردو را به عنوان یک ماده ضد باکتریایی برای درمان بیماری پیشنهاد نمود.

تقدیر و تشکر

از معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به دلیل تامین هزینه و امکانات این طرح و همچنین از کارکنان مرکز تحقیقات گیاهان دارویی به دلیل همکاری در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

هیدروکسیل روی حلقه‌ی فنلی دارد و ادعا شده که ارتباط مستقیمی بین تعداد گروه‌های هیدروکسیل و سمیت آن‌ها روی میکروارگانیسم‌ها وجود دارد (۱۸) و فنل‌های اکسید شده نیز اثر شدیدتری اعمال می‌کنند (۱۹). همچنین ادعا شده که مکانیسم احتمالی این ترکیبات مهار آنزیمی از طریق واکنش با گروه‌های سولفیدریل یا واکنش‌های غیر اختصاصی با پروتئین‌های میکروبی است (۲۰).

فلاون‌ها، فلاونوئیدها و فلاونولها نیز ساختمان فنولی داشته، اثر ضد میکروبی دارند. اثر ضد میکربی آن‌ها احتمالاً ناشی از ترکیب پروتئین‌های خارج سلولی و یا تشکیل کمپلکس با دیواره سلولی و یا ایجاد اختلال در غشای سلول میکروارگانیسم‌ها است (۲۱). کاتشین یکی از فلاونوئیدهای برگ گردوست (۱۴) که در چای سبز نیز موجود است و خاصیت ضد میکروبی چای سبز نیز به همین ماده نسبت داده شده است (۲۲). بعضی از فلاونوئیدها از جمله گلسیریزین (۲۳) و چریزین (۲۴) روی HIV نیز موثرند.

تانن‌ها نیز گروهی از ترکیبات فنلی هستند که با رسوب ژلاتین محلول اثر قابض دارند. این مواد در قسمت‌های مختلف گیاه ممکن است یافت شوند و در برگ گردو نیز وجود دارند. اثر ضد میکروبی آن‌ها را مربوط به مهار قدرت چسبندگی میکروب و همچنین مهار فعالیت آنزیمی و پروتئین‌های ترنسپورتر می‌دانند (۲۵ و ۲۶).

ترکیبات فنلی به‌خصوص فلاونوئیدها علاوه بر اثر ضد میکربی، به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی قوی نیز بسیار مفید هستند. این مواد با بدام انداختن رادیکال‌های آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو و همچنین مهار ماکرومولکول‌های اکسیداسیون خطر بیماری‌های دژنراتیو را کم می‌کنند (۲۷ و ۲۸). کلاً مواد آنتی اکسیدان علاوه بر درمان یا پیشگیری از سرطان، در پیشگیری از بعضی از بیماری‌های قلبی و عروقی، کاتاراکت، اختلالات مغزی و سیستم ایمنی، در جلوگیری از پیری زودرس ناشی از عوامل اکسیداتیو نیز

References

- 1- Margolis DJ, Bowe WP, Hoffstad O, Berlin JA. Antibiotic treatment of acne may be associated with upper respiratory tract infections. *Arch Dermatol*. 2005; 141: 1132-36.
- 2- Thiboutot DM, Gollnick HP. Treatment considerations for inflammatory acne: clinical evidence for adapalene 0.1% in combination therapies. *J Drugs Dermatol*. 2006; 5: 785-94.
- 3- Kim SS, Kim JY, Lee HN, Hyun GC. Antibacterial and anti-inflammatory effects of Jeju medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J Gen Appl Microbiol*. 2008; 54: 101-6.
- 4- Mallon E, Newton JN, Klassen A, Stewart-Brown SL, Ryan TJ, Finlay AY. The quality of life in acne: a comparison with general medical conditions using generic questionnaires. *Br J Dermatol*. 1999; 140: 672-6.
- 5- Ahmadi F, Rashedmarandi F, Saghari H, Emamehkhoo H. Evaluation of AntibioGram pattern of *Propionibacterium acnes* Obtained from Skin of Patients with Acne Vulgaris. *Pajoohandeh*. 2007; 12: 229-34.
- 6- Emami A, Shams-Ardekani MR, Nekoei-naeini N. [Translation] Valnet J. Phytotherapy, treatment of disease by plants. Tehran: Rahe-Kamal press; 2002.
- 7- Sharafati chaleshtori F, Sharafati chaleshtori R, Momeni M. Comparison of the antimicrobial effects of the ethanolic and aqueous extracts of *Scrophularia striata* on *Escherichia coli* O157:H7 in vitro. *Shahrekord Uni Med Sci J*. 2009; 10: 32-8.
- 8- Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Ferreira Ic, Bento A, Estevinho L. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46: 2103-11.
- 9- Kim SS, Baik JS, Oh TH, Yoon WJ, Lee LH, Hyun CG. Biological activity of Korean Citrus *obovoides* and *Citrus natsudaoides* essential oils against *Acnes*- inducing bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008; 72: 2507-13.
- 10- Nariman F, Eftekhari F, Habibi Z, Falsafi T. Anti-helicobacter pylori activities of six Iranian plants. *Helicobacter*. 2004; 9: 146-51.
- 11- Baron EJ, Finegold SM. Diagnostic Microbiology. New York: Mosby; 1990.
- 12- Baron EJ, Finegold SM. Methods for testing antimicrobial effectiveness. In: Bailey, Scott's, eds. diagnostic microbiology. New York: Mosby; 1994.
- 13- Clinical and laboratory standard institute. performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. USA: NCCLS press; 2005.
- 14- Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, et al. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45: 2287-95.
- 15- Mehrbanian S, Majid A, Majid I. Anti microbial effects of three plants (*rubia tinctorum*, *cartamus tinctorius* and *juglans regia*) on some air borne micro organisms. *Aerobiologia*. 2000; 16: 455-8.

- 16- Duke JA. Juglans regia. handbook of energy crops. Center for new crops & plants products. Available from: URL: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Juglans_regia.html.
- 17- Tim Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 2005; 26: 343-56.
- 18- Geissman TA. Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds. In: Florkin M, Stotz EH, eds. Pyrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents. New York: Elsevier press; 1962, 265.
- 19- Urs NVRR, Dunleavy JM. Enhancement of the bactericidal activity of a peroxidase system by phenolic compounds (*Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis*, soybeans). *Phytopathology*. 1975; 65: 686 - 90.
- 20- Mason TL, Wasserman BP. Inactivation of red beet beta-glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry*. 1987; 26: 2197-202.
- 21- Tsuchiya HM, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, Tanaka T, Iinuma M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol*. 1996; 50: 27-34.
- 22- Toda M, Okubo S, Ohnishi R, Shimamura T. Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea. *Jpn J Bacteriol*. 1989; 45: 561-66.
- 23- Watanabe H, Miyaji C, Makino M, Abo T. Therapeutic effects of glycyrrhizin in mice infected with LP-BM5 murine retrovirus and mechanisms involved in the prevention of disease progression. *Biotherapy*. 1996; 9: 209-20.
- 24- Critchfield JW, Butera ST, Folks TM. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996; 12: 39.
- 25- Ya C, Gaffney SH, Lilley TH, Haslam E. Carbohydrate-polyphenol complexation. In: Hemingway RW, Karchesy JJ, eds. Chemistry and significance of condensed tannins. New York: N.Y. Plenum Press; 1988.
- 26- Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 1991; 30: 3875-83.
- 27- Silva BM, Andrade PB, Valentão P, Ferreres F, Seabra RM, Ferreira MA, Quince (Cydonia oblonga Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. *J Agric Food Chem*. 2004; 52: 4705-12.
- 28- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem*. 2000; 48: 3396-402.
- 29- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *PNAS*. 2003; 90: 7915-22.

Antibacterial Effects of Ethanolic Extract of Walnut Leaves (*Juglans Regia*) on *Propionibacterium Acnes*

Sharafati-chalesshtori A¹, Sharafati-chalesshtori R², Sharafati-chalesshtori F¹, Rafieian M¹

¹Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

²Research and Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Sharafati-chalesshtori R, Islamic Azad University, Research and Sciences Branch, Tehran, Iran

E-mail: sharafati33@yahoo.com

Received: 14 Sep 2009 **Accepted:** 2 Feb 2010

Background and Objective: Acne is one of the medical problems and *propionibacterium acnes* is the pathogenic agent that has received a considerable attention. Different parts of *Juglans regia* have been shown to have antibacterial activity on many bacteria. Its leaves have antioxidant property and if it shows antibacterial effect on *propionibacterium acnes*, it might be an alternative drug for the treatment of this problem. Therefore, this study was aimed to determine the antibacterial effects of walnut leaves on *propionibacterium acnes* in vitro.

Materials and Methods: In this experimental study, ethanolic extract of walnut leaves was examined for antibacterial activities on *propionibacterium acnes* using the disk-diffusion minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bacterial concentration (MBC) and macrodilution methods. Ampicillin (10µg) was used as a positive control.

Results: Ethanolic extract of walnut leaves had an inhibitory effect on *Propionibacterium acnes* using the agar-diffusion and macrodilution methods. The most inhibition zone was 25 ± 1.7 mm in 150 mg/ml concentration. The minimum inhibitory concentration was 12.5 mg/ml while the minimum bactericidal concentration was 15 mg/ml.

Conclusion: The findings of this study showed that ethanolic extract of walnut leaves had antibacterial effect on *Propionibacterium acnes* and may be considered as an alternative drug for the treatment of external infections due to this microorganism.

Key words: Antimicrobial effects, *Juglans regia* leaves, *Propionibacterium acnes*